

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

台灣野生大豆的基因體組成及其起源之研究(2/3) 期中進度報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2313-B-002-018-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學農藝學系暨研究所

計畫主持人：謝兆樞

處理方式：期中報告不提供公開查詢

中華民國 96年06月06日

行政院國家科學委員會專題研究計畫進度報告

台灣野生大豆的基因體組成及其起源之研究(2/3)

Studies on the origin and genome structure of wild soybean species
collected in Taiwan (2/3)

計畫編號：NSC 95-2313-B-002-018

執行期限：自民國 95 年 8 月 1 日起至民國 96 年 7 月 31 日

主持人：謝兆樞 執行機構及單位：國立台灣大學農藝學系

一、 中英文摘要

台灣位處大豆屬一年生 *Soja* 亞屬與多年生 *Glycine* 亞屬分佈的交界，境內有多個多年生 *Glycine tomentella* 搜集系，分布在台灣東部的 *G. tomentella* 搜集系與台灣其他地區的 *G. tomentella* 搜集系在外型上明顯有異。日籍學者依據外在性狀於 1991 年提出成立為新種 *G. dolichocarpa*，然而不論分類上的爭議如何，這些搜集系的基因組組成仍然未知。先前的研究曾利用不同的策略探討整個 *G. tomentella* species complex 的基因組組成，提出 *G. tomentella* T2 同功酶群(isozyme group)可能的基因組組成為 AADD、DDD₃D₃。其中 AADD 是 Hymowitz 等人以人工雜交方式所推論的結果，而 DDD₃D₃ 是由 Doyle 等人以 Histone H3-D 序列分析所得的結論。本年以掃描電顯觀察種實性狀、種子蛋白條帶圖譜，並在細胞遺傳上以兩者雜交產生可稔後代的證據說明 *G. dolichocarpa* 屬於 *G. tomentella* T2 同功酶群。最後以種子蛋白電泳進行 *in gel* hybridization 研究，結果支持 DDD₃D₃ 假說。

關鍵詞：種子蛋白、絨毛大豆物種複

合群、同功酶群、扁豆莢大豆、掃描電顯、*in gel* hybridization

Abstract

Taiwan is the southernmost of the distribution for annual wild soybean and the northernmost of the distribution of the perennial wild soybean. There are many accessions of *G. tomentella* species complex collected in Taiwan. The accessions collected in Taitong are different in phenotype with other accessions collected in other collection sites in Taiwan. They were described as a new species, *G. dolichocarpa*, by Tateishi and Ohashi at 1991, and the genome composition of this tetraploid species is still unknown. For the genome component of *G. tomentella* T2 isozyme group, two research groups brought up different conclusion using different strategies, AADD was suggested by Hymowitz' team using artificial synthesis polyploidy method, nevertheless, DDD₃D₃ was proposed by Doyle's group by Histone H3-D sequence analysis. In this study, we survey the seed variation by using SEM,

investigate seed protein profile by using 2-D electrophoresis, and identify the genome relationship by making cross between *G. dolichocarpa* and *G. tomentella* T2 isozyme group. The result of *in gel* hybridization experiment of seed protein supports the DDD₃D₃ hypothesis.

Keywords: seed protein, *Glycine tomentella* species complex, isozyme group, *G. dolichocarpa*, SEM, *in gel* hybridization

二、緣由與目的

大豆屬分成兩個亞屬，分別是一年生的 *Soja* 亞屬，包含兩個物種，栽培種 *G. max* 與近緣種 *G. soja*，以及多年生的 *Glycine* 亞屬，目前包含二十四個物種。*G. soja* 分布在西伯利亞、日本、韓國、中國大陸及台灣，而 *Glycine* 亞屬物種主要分布在澳洲大陸。在本實驗室所獲得的野生大豆種原搜集系中，分布在台灣台東地區的 *G. dolichocarpa* 的分類地位一直以來並不明確，按照 Doyle *et al.* 2002 描述，它可能屬於 *G. tomentella* 基因組複合體中的 T2 isozyme group。

由於整個 *G. tomentella* 基因體組成過於複雜，採用不同的方法分析得到的結論並不一致。目前 T2 isozyme group 的基因組組成存在著兩種說法，一個是康乃爾大學 Dr. Doyle 根據 Histone-H3 序列資料所提出的 DD、D3D3 兩種貢獻親。而另一個則是伊利諾大學 Dr. Hymowitz 所提出的 AA、DD 兩種貢獻親，他們將兩個不同的

AA 二倍體先雜交，再與一個 DD 二倍體物種雜交人工合成四倍體物種 (AADD)，然後利用此一人工合成四倍體與待檢測的四倍體物種雜交，由於此待檢測的天然四倍體可與人工四倍體雜交並產生可稔後代，因此判斷此一天然四倍體的基因組是 AADD。

為了解決 *G. dolichocarpa* 的分類以及判定其基因組組成，我們利用植株性狀、種子蛋白條帶圖譜、ITS sequence 及雜交產生可稔後代的證據說明 *G. dolichocarpa* 屬於 *G. tomentella* T2 同功酶群。並以這些可能是 T2 isozyme group 物種的二倍體貢獻親搜集系種子蛋白電泳進行 *in gel* hybridization 研究來解決問題。

三、結果與討論

本實驗室在過去多年針對台灣的 *G. dolichocarpa* 搜集系及澳洲的其他 *G. tomentella* 物種複合群搜集系所進行的研究，已獲得如下之成果，分述如下：

利用掃描式電子顯微鏡 (SEM) 檢視豆科植物子葉表面特殊構造

Pit 是位於大豆子葉下表皮表面，維管束主脈（中肋）上方，一塊具有巨大化細胞的區塊，準確的說，它的細胞形態與鄰近表皮細胞有著顯著差異，不僅變大而且經常在周邊呈現彎曲 (zigzag) 狀態；而 antipit 則是位於種皮內層（胚乳層）上與 pit 相對應位

置上，彼此緊密嵌合。這樣的構造隨後在其他大豆屬物種上發現，但是當時 SEM 不僅昂貴也不普及，難以大量運用於研究；且這種構造有時較為平整，解剖顯微鏡未必能察覺，因此，並無其他的相關報告推出。實驗初期，我們利用解剖顯微鏡也未能察覺菜豆族其他食用豆類存在著這樣的構造，一度以為這是大豆屬專有的特徵。

觀察不同發育時期的大豆種子，我們發現 pit 的構造大約在開花後 10-15 天的豆子開始出現，隨著發育天數增加，這個區塊的細胞特化得更大，也經細胞分裂而變得更多，整個 pit 的面積也隨之增大，直到 40-45 天達到最大，約佔子葉表面積的 1%，這時特化的細胞數目約在 400 個上下。此外，文獻指出，pit 在種子浸水發芽後三天會消失不見，但是我們觀察到，直到子葉從幼苗脫落，pit 依然清晰可見。

透過共軛焦顯微鏡，我們知道 pit 區塊細胞具有 cell wall ingrowth，這種細胞壁二次增生是 transfer cell 的特徵，與養分的傳輸有關。大粒種的大豆品種（高雄 7 號）相較於中粒種品種

（十石）有明顯的 pit 構造。但是野生大豆有不同大小的種子，而且它們都具有約略相同大小的 pit 構造，因此，儘管我們懷疑 pit 的功能與養份傳輸吸收有關，卻無法解釋種子大小是否與 pit 大小有直接的關係。

研究中期，我們意外發現蝶豆 (*Clitoria ternatea*) 及山珠豆 (*Centrosema pubescens*) 新鮮充實種子的子葉可以用肉眼觀察到疑似 pit 的構造，而由 SEM 的結果證實這樣的構造與我們在大豆屬物種看到的是一樣的，因此，我們開始針對其他豆科植物展開調查。透過野外採集、標本館取樣，或是由台大植物系胡哲明老師提供珍藏的豆科種原以及畜產試驗所提供的豆科牧草種原，我們總共得到 87 個大豆屬之外的搜集系，這些搜集系包括了蘇木、含羞草與蝶形花三個亞科。經過 SEM 仔細觀察，目前我們知道主要在蝶形花亞科的數個族，包括菜豆族的物種都曾演化出 pit 這個構造。

由人工雜交試驗驗證 *G. dolichocarpa* 基因組組成

在台灣有兩種外型截然不同的植

物都叫做 *G. tomentella*，鑒於外型的差異，1991 年日籍植物分類學者將其中一個具有長豆莢的類型命名為 *G. dolichocarpa*。1997 年我們獲得伊利諾大學 Hymowitz 教授贈與的多個澳洲 *G. tomentella* 搜集系，經由植株外表性狀比對以及經過 GmPM 系列抗體所得到的 Western bolt 結果，我們知道 *G. dolichocarpa* 應該屬於 *G. tomentella* 的 T2 race。

其中一個與 *G. dolichocarpa* 相似的搜集系 Tom056，由 Hymowitz 教授的人工雜交試驗結果，認為是 AADD 基因組，因為 Tom056 可以跟這個人工合成四倍體[(AA X AA) X DD] 雜交產生可稔後代。但是 2002 年康乃爾大學 Doyle 教授發表由 Histone H-3D 序列所建構的 *G. tomentella* 物種複合群親緣關係樹，以及隨後 2004 利用這些序列資料推論各種異源四倍體的可能二倍體親本，結果指出 T2 race 的基因組組成應該是 DDD3D3。

上述的結果看似差異極大，但實際上由 ITS 或 Histone 的序列分析資料，我們得知所謂的 D3 基因組應該是 A 基因族的一員，而 Doyle 教授研究團

隊也給予新的基因組編號 A4。所以看來，兩方研究人員的歧異似乎縮小許多，而共通的結論是 T2 race 由 A 與 D 基因組物種雜交而來。但是究竟這個 A 基因組是 A (*G. canescens*) 還是 A4 (*G. syndetika*)，才是 *G. dolichocarpa* 的親本呢？

為了回答這樣的問題，我們進行不同組合的人工雜交試驗來找出答案。我們的雜交試驗（正反交）指出 *G. dolichocarpa* 可以跟 *G. tomentella* T2 race 雜交並產生可稔後代，這項證據也加強說明 *G. dolichocarpa* 是所謂的 *G. tomentella* T2 race。在可能的二倍體親本雜交的組合中，我們也只在 DD x D3D3 的組合得到一個發育不良的豆莢，由於這個豆莢只有正常母本的一半厚度，我們知道這朵花的確完成了雜交，排除了自交的可能，同時，也告訴我們在大豆屬 A-I 基因族中，D 與 D3 (A4) 基因組有較相近的親緣關係。此外，似乎也說明 *G. dolichocarpa* 應該是具有 DDD3D3 基因組組成。但是這樣獲得的證據不夠完整，因此，我們接著利用 *in gel* hybridization 蛋白電泳方法進一步的加以證實。所謂的

in gel hybridization 是將可能的二倍體親本種子蛋白等量混合 (A+D 或 D+D3) 跑在 SDS-PAGE 的同一行，並與四倍體個體進行蛋白條帶比較，而結果顯示 D +D3 的蛋白圖譜與 *G. dolichocarpa* 完全一致。因此，綜合我們的人工雜交試驗與種子蛋白 *in gel* hybridization 的結果，我們支持 *G. dolichocarpa* 具有 DDD3D3 基因組這樣的推論。

四、計畫成果自評

本年計畫執行順利，成果良好，部分成果已發表：

1. Tsai Y. C. et al. 2006. Using seed protein electrophoresis profile and western blotting to analyze the classification of *Glycine* species. *Crop, Environment and Bioinformatics* 3:159-176.
2. Tsai Y. C. et al. 2006. Seed coat variation in genus *Glycine* surveyed by scanning electron microscopy. *J. Genet. Cell Biol.* 17:131-141.
3. Liu Y. S. et al. 2006. Intelligent spot detection for 2-DE gel image. *Lecture Note compt.* 4319:168-177.

五、參考文獻

Brown, A. H. D., Doyle, J. L., Grace, J. P., and Doyle, J. J. 2002. Molecular

phylogenetic relationships within and among diploid races of *Glycine tomentella* (Leguminosae). *Aust. Syst. Bot.* 15:37-47.

Doyle, J. J., Doyle, J. L., Brown, A. H. D., and Palmer, R. G. 2002. Genomes, multiple origins, and lineage recombination in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploidy complex: histone H3-D gene sequences. *Evolution* 56: 1388-1402.

Doyle, M. J., and A. H. D. Brown. 1985. Numerical analysis of isozyme variation in *Glycine tomentella*. *Biochem. Syst. Ecol.* 13: 413-419.

Doyle, M. J., J. E. Grant, and A. H. D. Brown. 1986. Reproductive isolation between isozyme groups of *Glycine tomentella* (Leguminosae), and spontaneous doubling in their hybrids. *Aust. J. Bot.* 34: 523-535.

Hsieh, J. S., K. L. Hsieh, Y. C. Tsai, and Y. I. Hsing. 2001. Each species of *Glycine* collected in Taiwan has a unique seed protein pattern. *Euphytica* 118: 67-73.

Hsing, Y. I. C., J. S. Hsieh, C. I. Peng, C. H. Chou, and T. Y. Chiang. 2001. Systematic status of the *Glycine tomentella* and *G. tabacina*

- species complexes (Fabaceae)
based on ITS sequences of
Nuclear ribosomal DNA. J.
Plant Res. 114: 435-442.
- Kollipara, K. P., R. J. Singh, and
T. Hymowitz. 1993. Genomic
diversity in aneuploid ($2n$
 $= 38$) and diploid ($2n = 40$)
Glycine tomentella revealed
by cytogenetic and
biochemical methods.
Genome 36: 391-396.
- Kollipara, K. P., R. J. Singh, and
T. Hymowitz. 1994. Genomic
diversity and multiple
origins of tetraploid ($2n = 78,$
 80) *Glycine tomentella*.
Genome 37: 448-459.
- Kollipara, K. P., R. J. Singh, and
T. Hymowitz. 1997.
Phylogenetic and genomic
relationships in the genus
Glycine Willd. Based on
sequences from the ITS
region of nuclear rDNA.
Genome 40: 57-68.
- Ohashi, H., Y. Tateishi, T.
Nemoto, and H. Hoshi. 1991.
Taxonomic studies on the
Leguminosae of Taiwan IV.
Sci. Rep. Tohoku Univ. 4th
ser. (Biol.) 40: 1-37.